Aus dem Forschungslaboratorium der Neurologischen Universitätsklinik Basel
(Direktor: Prof. *F. Georgi*)

Über die Aktivität von Caeruloplasmin bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen, im besonderen bei multipler Sklerose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Universität Basel

1963

vorgelegt von

Guido FISCH

von Aarau und Brugg

19 64

Verlag von S. Karger in Basel/Schweiz

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Prof. F. Georgi

Tag der Promotion: 1. März 1963

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Sonderdruck aus *Confinia Neurologica* Vol. 24, Nr. 3/4 (1964)

Einleitung

Mit der Aktivität des Caeruloplasmins im Blute von Nerven- und Geisteskranken haben sich schon zahlreiche Autoren befaßt. Hier handelt es sich im wesentlichen um einen weiteren Versuch, dem Vorkommen und der Bedeutung dieses Enzyms nachzugehen und u. a. seinen diagnostischen Wert zu überprüfen.

Hinsichtlich theoretischer Vorstellungen und eventueller klinischer Bedeutung seien im folgenden die wichtigsten Erkenntnisse und Arbeiten besprochen.

Das Caeruloplasmin hat seinen Namen seiner bläulichen Farbe (caeruleus = blau) wegen und wird häufig fälschlich mit «Coeruloplasmin» aus dem englischen «ceruloplasmin» übersetzt [50]. *Holmberg und Neish* [26, 37] fanden beim Menschen und bei der Ratte den Kupferspiegel im Plasma und die Oxydaseaktivität des Plasmas in einem bestimmten konstanten Verhältnis. Nach *Abood und Gibbs* [1] ist Caeruloplasmin ein kupferhaltiges Protein, welches p-Phenylendiamin, N,N'-dimethylparaphenylendiamin oder Adrenalin [2] oxydiert. Andere Autoren wie *Bearn und Kunkel* [4, 5] sowie *Blaha* u. Mitarb. [8] haben statt Caeruloplasmin die p-Polyphenoloxydase im Blute bestimmt. Es bestehen in der Tat Anhaltspunkte für die Annahme, daß die Aktivität des sogenannten Serumkupferenzyms oder der Serumkupferoxydase auf das Caeruloplasmin zurückzuführen ist [26], welches eine Laccase-ähnliche Aktivität [50] besitzt. Gereinigtes Caeruloplasmin ist sehr empfindlich gegenüber der Konzentration zahlreicher Ionen und gegenüber dem pH [25].

Erstmals wurde Caeruloplasmin 1948–1951 durch *Holmberg und Laurell* [23] isoliert. Man findet es vergesellschaftet mit: Hexosamin, Hexose und Neuramin-

säuren [49]. Spektrophotometrisch bestimmt, beträgt seine Serumkonzentration beim Normalen 18,1 mg% [47], immunochemisch bestimmt 33,5 mg% [47] *(Scheinberg und Gitlin)*, während *Schwob und Lambert* [52] als normale Plasmakonzentration von Caeruloplasmin 30 mg% angeben. *Rice* [40] drückt die Caeruloplasminaktivität im Serum in Internationalen Einheiten aus und gibt als Normalwert 35–65 IE an.

Das Caeruloplasmin fällt nach Immunelektrophorese mit Anticaeruloplasmin-Immunserum von Kaninchen als α_2-Globulin aus [41]. Durch Herstellung von Subfraktionen von Caeruloplasmin mit Plasma von 9109 Menschen (durch chromatographisches Auftragen auf Säulen von Diäthylaminoäthyl-Cellulose und Hydroxylapatit und Weiteranalysierung durch Elektrophorese auf Stärkegel bei pH von 8,5 und 5,7) konnte *Morell* [35] 4 verschiedene Caeruloplasmine nachweisen, von welchen 2 im Histidingehalt verschieden waren [10, 44, 55].

Caeruloplasmin enthält pro Molekül 8 Atome Kupfer, was 0,32–0,35 Gewichtsprozent entspricht [19, 20, 23, 33, 51, 52]. Sein Molekulargewicht beträgt annähernd 151 000 [19, 33, 52]. Es hat, wie gesagt, die Eigenschaften einer Oxydase und ist ein α_2-Globulin [19, 20, 33, 52], dessen Plasmakonzentration mit ungefähr 30 mg% beim Normalen rund 0,5% aller Plasmaproteine ausmacht [52]. Bei normalem Blutkupferspiegel (80–150 γ% [29, 42]) findet man 90–96% des Kupfers an das Caeruloplasmin gebunden [28, 42, 52]; man kann dieses Kupfer indirekt mit Natriumdiäthyldithiocarbamat nachweisen [52].

Beim menschlichen Caeruloplasmin haben nicht alle 8 Kupferatome dieselben Affinitäten, denn bei der Verdauung mittels Chymotrypsin werden nur 4 Kupferatome frei, während die anderen 4 Kupferatome im chymotrypsinresistenten Molekülanteil verbleiben [17]. Das Verhältnis der Paraphenylendiamin-Oxydaseaktivität/μg indirekt reagierendes Plasmakupfer (s. später) ergibt bei verschiedenen Tierarten in der Reihenfolge Meerschwein/Mensch/Katze/Hund und Schaf ein ungefähres Verhältnis von 8:4:2. Wenn man in Betracht zieht, daß menschliches Caeruloplasmin 4 Kupferatome hat, die labiler als die anderen sind, könnte man annehmen, daß bei verschiedenen Säugetierarten eine verschiedene Anzahl von katalytisch aktiven Kupferatomen im Caeruloplasminmolekül vorhanden sind [14].

Caeruloplasmin ist heterogenetisch ähnlich wie Hämoglobin, Albumin, Haptoglobin und Transferrin. Es wurden bisher 4 verschiedene Caeruloplasmine beschrieben und zwei weitere vermutet [35, 36]. Zwei der verschiedenen Caeruloplasmine sind nicht zu unterscheiden in bezug auf Farbe, Kupfergehalt, Kupferaustauschfähigkeit und Oxydasenaktivität [35, 36].

Nach Zusatz von markiertem Kupferchlorid zu Menschenserum fand *Horst* [28] den Hauptanteil des Kupfers an das Albumin gebunden; das Albumin scheint eine unbegrenzte Bindungskapazität für Kupfer zu haben. Peroral oder parenteral zugeführtes, radioaktives Cu^{64} bindet sich im Serum Gesunder zuerst locker an das Albumin und an verschiedene Globuline. Schon nach zwei Stunden sind aber 81% des Radiokupfers im Bereich des α-Globulins lokalisiert, wahrscheinlich in Form von Caeruloplasmin [28, 58]. Die Radioaktivität des α-Globulins bleibt dann über mehrere Tage unverändert hoch. Man hat offenbar mit einer raschen Konversion des labilen Albuminkupfers in das stabile α-Globulin-Kupfer zu tun. Auch *Bearn und Kunkel* [5, 6, 7] schreiben, daß per os absorbiertes Kupfer zuerst an die Albumine fixiert wird, um dann normalerweise innerhalb 24 Stunden fast vollständig an Globulinen gebunden zu sein.

Im menschlichen Plasma wurden zwei verschiedene Kupferarten nachgewiesen [21]:

a) *Direkt reagierendes Kupfer:* Es reagiert ohne Vorbehandlung mit Natrium-diäthyl-dithiocarbamat.

b) *Indirekt reagierendes Kupfer:* Es reagiert erst nach saurer Deproteinisierung des Plasmas mit Natrium-diäthyl-dithiocarbamat. Es entspricht dem eigentlichen Caeruloplasminkupfer und ist bei verschiedenen Tierarten in einem verschieden hohen Prozentsatz vom totalen Plasmakupfer vorhanden.

Durch Bestimmung des totalen Plasmakupfers, der direkt reagierenden sowie der indirekt reagierenden Plasmakupferfraktion kann man ebenfalls den Caeruloplasminspiegel messen [43]. *Gubler* u. Mitarb. [21] haben beim Menschen 96% indirekt reagierendes Kupfer im Plasma gefunden. Beinahe alles indirekt reagierende Plasmakupfer liegt in Caeruloplasminform vor und die Unterschiede in der Oxydasenaktivität bei verschiedenen Tiergruppen sind wahrscheinlich bedingt durch artspezifische Unterschiede im eigentlichen Kupferprotein [14]. Trotz Caeruloplasminmangel kann der Kupferblutspiegel erhöht oder normal sein [52]. Der Serumkupferüberschuß ist in solchen Fällen an andere Proteine als das Caeruloplasmin gebunden: wie wir gesehen haben, an Albumine, aber auch an freie Aminosäuren und Siderophilin, was die Beobachtung von *Boudin und Pepin* [9] erklären könnte, nach der in drei solchen Fällen der Bluteisenspiegel erniedrigt war.

Angel u. Mitarb. [3] bewiesen, daß die Epinephrin- und die N,N'-dimethyl-p-phenylendiamin-Oxydation einander sehr ähnliche Vorgänge sind und daß die Konzentration an reduziertem Glutathion sich dazu umgekehrt proportional verhält. Weiter beschrieben diese Autoren, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in Proportion zur Ascorbinsäure- und Caeruloplasminkonzentration stehe. Wenn der Ascorbinsäurespiegel erhöht ist, dann tritt eine Verzögerung ein. Als eigentlicher Verzögerer der Reaktion kommt in erster Linie das Albumin [22] in Frage, sodann auch das Glutathion der Erythrocyten, während die Ascorbinsäure nicht auf den Oxydationsprozeß selbst einwirkt, sondern auf dessen Endprodukt, indem dieses wieder reduziert wird.

Klinische Bedeutung des Caeruloplasmins

Am Ende der Schwangerschaft kann mütterliches Serum zwei- bis dreimal die normale Caeruloplasminkonzentration erreichen [33, 45]. Dies kann damit erklärt werden, daß ja auch bei Östrogenbehandlung die Caeruloplasminkonzentration erhöht sein kann [35]. Diese Feststellungen wurden übrigens bei der Behandlung des Morbus Wilson insofern berücksichtigt, als versucht wurde, mit Östrogengaben den Caeruloplasminspiegel zu heben [35].

Eine Erhöhung der Konzentration von Kupfer und Caeruloplasmin im Serum wurde in folgenden Fällen gefunden [35]:

Infektionskrankheiten, Myokardinfarkt, verschiedene neurologische Erkrankungen außer Morbus Wilson, Eisenmangelanämien, Hyper-

thyreoidismus, Pfortadercirrhose, Gallenwegsinfektionen, Hepatitis epidemica und posthepatische Zirrhose, Pellagra, chronischer Alkoholismus, Morbus Hodgkin, akute und chronische Leukämie, Karzinom und nach längerer Behandlung mit Testosteron (nach dem Ende einer Androgen- oder Östrogenbehandlung können 8 Wochen verstreichen, bis der Caeruloplasminspiegel wieder normal ist).

Eine Erniedrigung der Konzentration von Kupfer und Caeruloplasmin im Serum kommt mehr oder weniger regelmäßig bei folgenden Krankheiten vor [35]: bei Frühgeburten, bei Neugeborenen, die an Hypoproteinämie und Hypoferrämie leiden, bei tropischer und bei nichttropischer Sprue, beim nephrotischen Syndrom (wegen Caeruloplasminverlust im Urin), bei Kwashiorkor und, wie schon erwähnt, bei Wilson-Patienten.

Über das von *Holmberg und Laurell* [23, 24] beschriebene, kupferhaltige Serumenzym, welches die Eigenschaft besitzt, Epinephrin, sowie zahlreiche andere Amine, wie Paraphenylendiamin und Derivate, zu oxydieren, berichten *Oezek* sowie *Leach und Heath*, daß bei akuten, schizophrenen Schüben, die Oxydationsquote gegenüber Normalseren oft erhöht sei [31, 38], wobei sich beide Gruppen jedoch überschneiden [31]. Bei einer gewissen Anzahl von Krankheiten, namentlich bei solchen mit Globulinerhöhungen, soll die Caeruloplasminkonzentration ebenfalls erhöht sein [12, 23, 24, 29].

Die Hyperkuprämie, die in der Schwangerschaft und bei Infekten auftritt, ist durch eine Vermehrung des indirekt reagierenden Kupfers bedingt. Diese Angaben werden gestützt durch die kürzlich von *Scheinberg* u. Mitarb. [46] mitgeteilten Untersuchungen an Plasma von Frauen kurz vor der Geburt und an Plasma von Neugeborenen. Das Caeruloplasmin beträgt bei der Frau kurz vor der Geburt durchschnittlich 55,6 (34,9–89,0) mg% (normal 36 mg%), beim Neugeborenen aber nur 6,5 (1,8–13,1) mg%. Dagegen ist nach oraler und i.v. Kupferverabreichung das direkt reagierende Kupfer vermehrt.

Bei hohen Caeruloplasminkonzentrationen fand sich eine erniedrigte Konzentration von Glutathion [34]; die erniedrigte Konzentration an reduziertem Glutathion bei akut an Schizophrenie erkrankten Patienten, kann mit dem erhöhten Caeruloplasminspiegel dieser Patienten in Verbindung gebracht werden. *Heath* [22] meint auf Grund von Fluoreszenz-Analysen, daß Epinephrin und Norepinephrin im Plasma sehr konstant sein sollen, und daß kein wesentlicher Unterschied zwischen normalen und schizophrenen Personen bestehe. Erhöhte Oxydation soll vielmehr eine Funktion von erhöhtem Ascorbinsäure-Verbrauch (d. h. Defizit im Blut) sein, als eine Funktion von erhöhter Caeruloplasminkonzentration.

Åkerfeldt [2] fand, daß Serum schizophrener Patienten N,N'dimethyl-p-phenylendiamin rascher oxydiert als Serum normaler Individuen. Er brachte diese Ergebnisse mit dem Caeruloplasmin in Beziehung und beschrieb einen Zusammenhang mit dem Ascorbinsäuregehalt des entsprechenden Serums; ferner erwähnt er auch den hemmenden Effekt von -SH-Gruppen auf die Oxydationsprozesse des Caeruloplasmins. *Åkerfeldts* Ergebnisse, wonach man die Caeruloplasminbestimmung als

diagnostisches Hilfsmittel bei Psychosen verwenden kann, beruhen insofern auf einem Irrtum, als bei chronisch verlaufenden Psychosen die Nahrungseinwirkung, sowie der Einfluß interkurrenter Krankheiten nicht in Betracht gezogen wurde [1, 49].

Wegen der besonderen Bedeutung, welche das Caeruloplasmin beim Morbus Wilson gefunden hat, sei dieser Erkrankung ein eigener Abschnitt gewidmet:

Morbus Wilson

Ein gesicherter Caeruloplasmindefekt findet sich, soweit wir heute sehen, bei der hepatolentikulären Degeneration (Morbus Wilson).

Schwob und Lambert [52] beschrieben die hepatolentikuläre Degeneration (Wilson-Westphal-Strümpellsche Krankheit) folgendermaßen:

«Klinisch: Neurologische Störungen, die hauptsächlich durch Läsionen, die am Striatum vorherrschen, durch eine gewöhnlich latente Leberzirrhose, durch Pigmentierungsstörungen an der Haut und hauptsächlich an den Augen verursacht wird.

Biologisch: Eine Hyperaminoazidurie und Kupferstoffwechselstörungen sind im Vordergrunde. Letztere bestehen in Hyperkuprurie, Caeruloplasmindefizit und einer Übersättigung gewisser Gewebe, namentlich im Bereiche der zentralen grauen Kerne und der Leber mit Kupfer.»

In bezug auf Caeruloplasmin und Kupferstoffwechsel bei Wilsonscher Krankheit äußert sich *Riva* [43] wie folgt:

«Es ist schon lange bekannt, daß bei Wilsonscher Krankheit der Kupferstoffwechsel gestört ist; man denke an die Kupferablagerungen im Kayser-Fleischerschen Kornealring, in der Leber, im Gehirn. Die im Schrifttum niedergelegten Angaben über den Kupferspiegel bei Morbus Wilson weichen stark auseinander; neben Vermehrungen finden sich auch starke Verminderungen des Serumkupfers erwähnt. Dagegen ist die vermehrte Kupferausscheidung im Urin unbestritten (625 γ in 24 Stunden statt normalerweise 30–60 γ [54]).»

Cartwright u. Mitarb. [11] haben bei Morbus Wilson eine Verminderung des totalen Plasmakupfers, eine Vermehrung der direkt reagierenden Kupferfraktion (beim Wilson im Durchschnitt 26γ% gegen 8γ% bei Normalen) und eine Vermehrung des Liquorkupfers (das nur direkt reagiert), eine große Zunahme der Kupferkonzentration in vielen Geweben (ausgenommen der Herz- und Skelettmuskel, die Lungen und Erythrozyten), eine stark positive Kupferbilanz und eine vermehrte Kupferausscheidung im Urin gefunden. Die Leber enthält 4–15mal mehr Kupfer, das Gehirn, im speziellen die zentralen, grauen Kerne, 6–8mal mehr als normalerweise. Auf Grund dieser Untersuchungen postulieren die Autoren einen kongenitalen Defekt der Caeruloplasminbildung mit daraus folgender Vermehrung der Kupferabsorption aus dem Darm und einer Ablagerung von Kupfer in den Geweben. Ein gestörter Kupferhaushalt in Gehirn und Leber ist ja bereits durch die Untersuchungen von *Cumings* [15, 16] bekannt und gesichert. Auch *Holmberg und Laurell* [23], sowie *Scheinberg und Gitlin* [47] bewiesen bei der Wilsonschen Krankheit einen Mangel an Caeruloplasmin.

Bearn und Kunkel [4, 5] bestimmten gleichzeitig das Kupfer in der durch die Elektrophorese auf einer Stärkeplatte gewonnenen α_2-Globulin-Fraktion und fanden es ebenfalls vermindert. Nach *Bearn und Kunkel* [6] ist eine Verminderung des Serumkupfers und eine Vermehrung der Kupferkonzentration im Urin die charakteristische biochemische Veränderung bei der Wilsonschen Krankheit.

Porter und Folch [39] haben ebenfalls durch Elektrophorese von Gehirneiweiß Wilson-Kranker eine Kupfer-Proteinverbindung, die von jener Normaler verschieden ist, nachweisen können.

Bei der Wilsonschen Krankheit findet sich noch eine andere, wenn auch nicht konstante Eiweißstoffwechselstörung: eine starke Aminoacidurie bei normaler Aminoacidämie [11, 8, 13, 27, 53, 54, 56]. Die genauere Ursache der Aminoacidurie ist nicht bekannt; es herrscht die Tendenz vor, die Aminoacidurie als Folge einer durch Kupferablagerung in den Nieren eintretenden Störung der Rückresorption der Aminosäuren und Peptide aufzufassen. Andererseits wird die Auffassung vertreten [11], daß die Aminosäuren – nach Art eines Chelats – das Kupfer an die Gewebe binden und in die Nieren transportieren, wodurch dessen Ausscheidung begünstigt wird. Es wurde auch die Beobachtung gemacht, daß durch Verabreichung einer eiweißreichen Diät und von Caseinhydrolysaten die Aminosäureausscheidung und damit auch die Eliminierung des Kupfers gefördert wird. «Versene» schien dagegen bei Wilsonscher Krankheit unwirksam zu sein [43]. Die Hyperkuprurie steht nicht in unmittelbarem Zusammenhange mit der täglichen Kupferaufnahme, aber mit der Proteineinnahme [7]. Nach *Uzmann* [57] scheint die Hyperkuprurie keinen Zusammenhang mit der Aminoacidurie zu haben, sondern vielmehr mit der Peptidurie.

Die Kuprämie scheint unwesentlich zu sein, indem in gewissen Fällen der Blutkupferspiegel sogar erniedrigt ist [52]. Durch radioaktives Kupfer konnte man die Kupferstoffwechselstörungen bei Morbus Wilson näher untersuchen. *Bearn und Kunkel* [7] beobachteten bei Morbus Wilson, daß radioaktives Kupfer, das entweder per os, oder aber i.v. eingenommen wurde, nach 24 Stunden noch an den Albuminen fixiert ist, während beim Normalen beinahe alles radioaktive Kupfer nach 24 Stunden an die Plasmaglobuline gebunden ist. Diese beiden Autoren schreiben auch, daß die anfängliche Abnahme der Serumaktivität bei den Kranken weniger rasch ist, als bei Gesunden; man findet aber bei den Kranken nicht wie bei den Gesunden eine Wiederzunahme der Radioaktivität in der 2.–4. Stunde nach Einnahme von Cu^{64}. Die Urinausscheidung von Cu^{64} ist bei Wilson-Patienten stark erhöht, während bei Normalen die Stuhlausscheidung relativ höher ist.

Schwob und Lambert [52] sind der Ansicht, daß der Begriff einer enzymatischen Störung den Verhältnissen beim Wilson am ehesten gerecht werde, ist doch bekannt, daß andere Metalle, mit ähnlichem Gewicht wie Kupfer, z. B. Mangan, sowohl das Nervensystem als auch die Leber schädigen können. Das Kupfer könnte z. B. in einem Enzym an die Stelle eines physiologisch wichtigen Ions treten. Was die zahlreichen Hypothesen zur Pathogenese des Morbus Wilson anbelangt, muß auf die interessanten Ausführungen von *Schwob und Lambert* in der Originalliteratur [52] verwiesen werden. Es seien hier nur noch kurz die Anschauungen von *Loiseau* und *Uzmann* erwähnt.

Loiseau [32] ist der Meinung, daß zahlreiche Enzyme Schwefelbindungen besitzen; das Kupfer könnte sich an die -SH-Gruppe fixieren, von welcher es durch B.A.L. entfernt würde (B.A.L. hat durch seine beiden -SH-Gruppen eine starke Affinität zu Schwermetallen und damit zu Kupfer [52] und wird deshalb zur Be-

handlung bei der Wilsonschen Krankheit verwendet). Der Mangel an Enzymen könnte sowohl die Gehirnläsionen, als auch die Schädigungen an den tubuli contorti der Niere und die Störungen im zentralen Nervensystem erklären.

Die Auffassung von *Uzmann* [57] scheint wohl die besten Erklärungen für die Fermentstoffwechselstörungen bei Wilsonscher Krankheit zu geben. Die Initialstörung liegt nach seiner Meinung bei einer Proteinstoffwechselstörung, die, sehr wahrscheinlich genetisch bedingt, zur Bildung von abnormalen Proteinen führt. *Uzmann* hat in der Leber eines Wilson-Patienten mittels Elektrophorese ein abnormales Protein entdeckt, welches die oben beschriebene Aktivität zum Kupfer hatte. Zerdrücktes Lebergewebe von Wilson-Patienten hat verglichen mit Leber vom Gesunden oder vom Zirrhotiker eine erhöhte Kupferaffinität. Die Hyperaminosäurediurese wäre bedingt durch eine kompetitive Reabsorption der Dipeptide, die Kupferstoffwechselstörung durch die selektive Affinität des Kupfers mit abnormal gebildetem Protein. Die Abnahme des Caeruloplasminspiegels wäre dann dadurch bedingt, daß das «Apocaeruloplasmin», das auf diese Art synthetisiert wurde, kein Kupfer für einen gleichen chemischen oder enzymatischen Effekt benötigt, oder aber, daß das Überangebot an Kupfer in der Leber die Synthese von Caeruloplasmin hemmt.

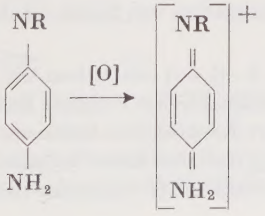
Nachdem wir somit gesehen haben, daß der Caeruloplasmingehalt, oder auf alle Fälle dessen Aktivität, bei verschiedenen Erkrankungen Schwankungen unterliegt und vor allem bei Morbus Wilson, welcher ja als *Entmarkungskrankheit* aufzufassen ist, offenbar eine wesentliche Rolle spielt, schien es uns von besonderem Interesse, das Verhalten dieses Enzyms bei *Multipler Sklerose* und Vergleichserkrankungen zu untersuchen.

Methode

A. Vorversuche

Als Grundlage unserer Methode dienten die Arbeiten von *Abood* [1] und *Åkerfeldt* [2], die wir vorerst reproduzierten, um dann zu einer eigenen, den gegebenen Verhältnissen angepaßten Methodik zu gelangen.

Aus den uns interessierenden Substratlösungen (N,N'-dimethyl-p-phenylendiamin (= DPP) und p-Phenylendiamin (= PPD) entstehen in Anlehnung an *Åkerfeldt* und *Abood* durch schwache Oxydation freie Radikale von Semichinon, das seine maximale Absorption bei 552 mμ (= Wursters Rot) hat; das nach dem folgenden Schema entstandene freie Radikal von DPP und PPD soll dabei für die Farbbildung verantwortlich sein:



Vorerst haben wir nach den Angaben von *Abood* [1] unter Verwendung von Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer und frisch zubereiteter Phenylendiaminlösung nach einstündiger Inkubation bei 37,0° C die Absorption des Reaktionsproduktes bei 490 mμ im Beckman-Spektrophotometer, Modell B, gemessen. Bei anderen Untersuchungen wurde als Substrat DPP verwendet, bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten und einer Wellenlänge von 550 mμ. Das Blut wurde zur Untersuchung in den der Entnahme folgenden 3 Stunden verwendet, einer Zeit, während welcher die Caeruloplasminkonzentration sich nicht verändert, sofern man das Serum im Eisschrank aufbewahrt.

Von den beiden oben beschriebenen Substraten wählten wir das DPP als das für unsere Zwecke günstigste aus. Anschließend führten wir Versuche durch, um die Wellenlängen mit maximaler Extinktion zu eruieren. Die Extinktionsmaxima wurden bei den Wellenlängen 510 und 550 mμ erhalten. Weitere Untersuchungen ergaben, bei einer gewissen Anzahl Seren, bei 410/415 mμ ein drittes Extinktionsmaximum (siehe Abb. 1), welches sich bei Anwesenheit von Substrat gegen 405 mμ verschob. Dies veranlaßte uns anzunehmen, daß bei 400/410 mμ optische Veränderungen vor sich gehen, die ebenfalls mit der Caeruloplasminaktivität im Zusammenhang stehen. Bei 470 mμ Wellenlänge fanden wir bei gewissen Seren ein Nebenmaximum vor, bei anderen nur eine Inflexion, so daß wir in unseren Versuchen bei allen Seren 4 Wellenbereiche in Betracht zogen: 400, 470, 510 und 550 mμ.

Da bei der Untersuchung der Caeruloplasminaktivität eine, je nach pH der Pufferlösung differente Extinktionskurve entstand, entschieden wir uns für die allerdings etwas komplizierte Methodik, alle Seren bei einem pH von 6,0 und 7,0 bei allen oben angegebenen Maxima zu untersuchen, wobei wir jedes Serum einmal als «frisch», d. h. in den ersten 3 Stunden nach Entnahme und einmal als «alt», d. h. mindestens 24 Stunden, nicht aber über 48 Stunden im Eisschrank aufbewahrt, durchuntersuchten. Auf die Aktivitätsprüfung bei einem pH von 6,0 sind wir durch die Untersuchungen von *Scheinberg und Morell* [48] hingewiesen worden. Es scheint, daß es für die Caeruloplasminwirkung mehr als einen optimalen pH-Bereich gibt (verschiedene Caeruloplasmine?). Es lag uns daher daran, durch Vergleich beider Methoden eventuelle Unterschiede bei den einzelnen Krankheitsgruppen zu erfassen.

Zur Ermittlung der Extinktionszunahme durch Einwirkung von Caeruloplasmin schlugen wir folgendes Procedere ein: Wir maßen die reine Serumextinktion und parallel dazu die Extinktion von Serum + Substrat nach einer Inkubation von 15 Minuten im Wasserbad von 37,0° C. Gleichzeitig inkubierten wir das Substrat allein (in gleicher Konzentration wie bei obiger Messung) und bekamen auf diese Art drei Meßwerte:

1. Reine Serumextinktion
2. Reine Substratextinktion
3. Extinktion von Serum + Substrat.

Durch Subtraktion von 3 − (1 + 2) ermittelten wir auf rechnerischem Wege die reine, durch die Caeruloplasminaktivität bedingte Extinktion. Eine Reihe von Versuchen, die wir auf obige Art durchführten, ließen uns feststellen, daß auf diese Art eine zu große Fehlerhäufung eintreten kann. Technisch bot sich die Möglichkeit zu versuchen, die Messung der Faktoren (1 + 2) in eine Ablesung zu kombinieren, indem

der Versuchsansatz zweimal, d. h. zur Zeit t = 0 und t = 15 abgelesen wurde; der Nullwert für jedes Serum stellt damit zugleich den Blindwert des ganzen Testsystems dar, da die Reaktion während der kurzen Zeitspanne vom Einfüllen bis zum Ablesen noch kaum merklich angelaufen ist.

B. Definitive Versuchsanordnung

1. *Serum:*

a) *Spender:* Es wurde Blut von Patienten verschiedener Krankheitsgruppen, insbesondere Multiplen Sklerosen, nüchtern genommen, wobei zu Vergleichszwecken auch Blut von Gesunden verwendet wurde.

b) *Gewinnung:* Frischblut nach etwa 2 Stunden zentrifugiert bei etwa 2500 U/Min. Das nach Zentrifugieren abpipettierte Serum wurde im Eisschrank bei 3–4° C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2. *Reagenzien:*

a) *Substrat:* N,N'-dimethyl-p-phenylendiamin (10 mg gelöst in 10,0 ccm H_2O dest.).

b) *Puffer:* Je nach Versuch Puffer von pH 7,0 oder pH 6,0.

pH 7,0: Tris-hydroxy-methylaminomethan 2,43 g in wenig H_2O dest. gelöst, dann Zugabe von 18,8 ml 1N–HCl. Nachher mit dest. Wasser bis 200 ml-Marke aufgefüllt. Molarität: 0,1 Mol.

pH 6,0: 13,6 g Na-Acetat-Trihydrat in etwa 80,0 ml dest. Wasser gelöst, mit etwa 0,4 ml 1N-HCl pH eingestellt und auf Marke 100 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Molarität: 0,1 Mol.

c) *Destilliertes Wasser:* Zur Befreiung von CO_2 täglich aufgekocht.

TABELLE I

Blindwert in Küvette I, Analysenwert in Küvetten II–IV

Versuchsansatz Küvetten		Substrat-Blindwert I	Versuchswert II–IV
	Serum	—	0,2
	Puffer	1,0	1,0
	H_2O dest.	0,2	—
	Substrat (0,1%)	0,1	0,1
später:	H_2O dest. zur Verdünnung auf benötigtes Meßvolumen	2,0	2,0

3. *Versuchsansatz und Messung:* Die vorliegende Art der Messung erübrigt, einen Serum-Blindwert zu führen. Jeder Ansatz enthält daher nur einen Substrat-Blindwert

und 3 Versuchswerte (vgl. Tab. I). Gemessen wurde im Beckmann-Spektrophotometer, Modell B, zwischen den Wellenlängen 390–415 mμ (von 5 zu 5 mμ) und 450–520 mμ, sowie 540–560 mμ (von 10 zu 10 mμ). Nach 15 Minuten Wasserbad bei 37° C erneute Messung der gleichen Bereiche. Zum Zwecke der Inkubation im Wasserbad wurde der Küvetteninhalt in je ein auf 37° C vorgewärmtes Reagensglas eingegossen und intensiv geschüttelt; die Küvette wurde umgekehrt auf ein Filterpapier gestellt. Nach Herausnahme aus dem Wasserbad wurden die Reagensgläser in Eiswasser abgekühlt und deren Inhalt sofort wieder in die entsprechenden Küvetten zur Messung transferiert. Es erfolgte durch alle Operationen hindurch eine exakte zeitliche Staffelung von Küvette zu Küvette.

4. *Diskussion und Versuchsanordnung:* Durch die obige Versuchsanordnung wurde in der ersten Messung der Ausgangswert und in der zweiten Messung der Caeruloplasminaktivitätswert nach 15 Minuten Inkubation bei den verschiedenen Wellenlängen in gleichmäßig gestaffelter Zeit gemessen. Da in beiden Messungen Serum + Substrat zusammen gemessen wurden, stellt die Differenz der beiden Messungen die reine Caeruloplasminaktivität dar unter Reduktion der in den Vorversuchen aufgefallenen Fehlermöglichkeiten auf ein Minimum.

Was die Substratautoxydation durch gelösten Luftsauerstoff betrifft, so wird diese durch Einfüllen gleicher Substratmengen in den Blindwert durch die Messung selbst eliminiert. Auf diese Art ist jeder Meßpunkt im Zeitpunkt t_0 (= I. Messung) zugleich Blindwert und die Subtraktion $t_{15}–t_0 = t_x$ (wobei t_{15} = II. Messung) ergibt, wie oben beschrieben, die eigentliche Aktivität der DPP-oxydase (= Caeruloplasmin). Die verschiedenen, in den Vorversuchen erwähnten Maxima, konnten daraufhin miteinander verglichen werden, nachdem sie über die erwähnten Wellenlängen erfaßt und kurvenmäßig dargestellt worden waren.

C. Besprechung einer Kurve (Abb. 1)

Charakteristisch für die ΔE-Kurven scheinen die beiden Maxima bei 510 + 550 mμ zu sein, wobei dasjenige bei 510 mμ im allgemeinen das Hauptmaximum darstellt. Beide Maxima weisen bei der Methode mit pH-6-Puffer drei- bis vierfach höhere Werte auf als bei pH 7. Daneben findet sich ein drittes Maximum im Gebiet um 470 mμ, welches jedoch häufig nur als Inflexion in Erscheinung tritt. Außerdem wird auch im Bereich zwischen 390–405 mμ gelegentlich ein Maximum gefunden, welches pH-unabhängig ist.

Werte bei *550 mμ:* In saurem Puffer deutliches Maximum, nicht aber bei entsprechender Messung in neutralem Puffer. Es handelt sich hier um die von *Abood* [1] und *Åkerfeldt* [2] beschriebene Wellenlänge für Wursters Rot (Maximum bei 552 mμ).

Beim Patienten in Abb. 1 scheint das Frischserum etwas aktiver zu sein als Altserum, d. h. die reduzierenden Substanzen scheinen hier keinen Einfluß ausgeübt zu haben: man neigt sogar eher zur Annahme, daß das Caeruloplasmin selbst im älteren Serum etwas an Aktivität eingebüßt hat.

D. Heterogenität des Enzyms

Das Verhalten der verschiedenen Maxima läßt vermuten, daß es sich bei der DPP-oxydase u. U. um verschiedene Fermente, die je nach Vorhandensein im Serum zu einer Mischung von verschiedenen Zwischenprodukten mit dem End-

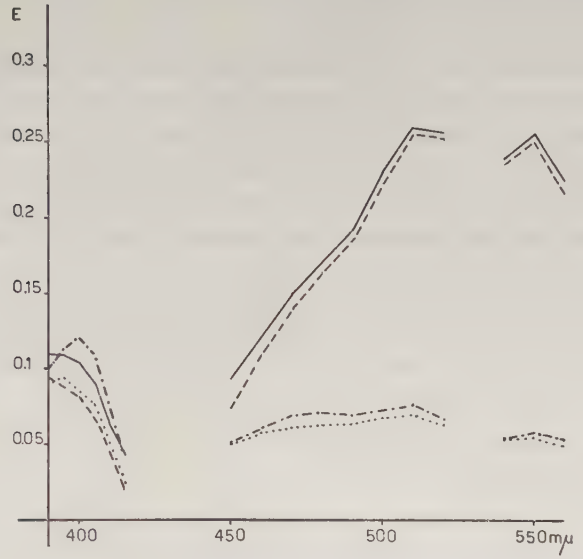


Abb. 1. ΔE-Kurve der Caeruloplasmin-Aktivität für Normalfall H. M. 1920.

pH 6 Serum frisch——— pH 7 Serum frisch –.–.–
Serum alt – – – – – Serum alt .....

Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktion.

produkt führen, oder um verschiedene, vielleicht durch Umwandlung serumeigener Substrate entstandene Endprodukte handeln könnte. Auf diese Weise ließen sich auch die bei unseren Messungen aufgetretenen Maxima erklären, die je nach Serum und je nach Patientengruppe verschieden hoch ausfallen. Dies entspräche auch ganz der Ansicht von *Morell*, der 4 verschiedene Caeruloplasmine nachwies [35], was mit der Auffassung von *Uriel*, *Broman*, *Curzon*, *McCosker*, *Scheinberg und Sankar* [10, 14, 17, 36, 44, 55] im Einklang steht.

Krankengut

Insgesamt wurden 155 verschiedene Seren untersucht (für die etwas später eingeführte pH-6-Methode nur 97 davon). Diese teilen sich bezüglich der Untersuchungen bei pH 6, resp. pH 7 in folgende Gruppen (vgl. auch Abb. 2) auf:

1. *Normalfälle* (5 bei pH 6, resp. 9 bei pH 7): Serum von Personen, die nachweisbar im Zeitpunkte der Blutentnahme an keiner Krankheit litten.

2. *Multiple Sklerose* (12, resp. 13): Auf Grund der Diagnose wurden die Resultate in 2 Gruppen getrennt; eine Gruppe leichter Fälle, d. h. poliklinisch kontrollierter,

noch teilweise arbeitsfähiger Patienten und eine Gruppe schwerer Fälle, d. h. vollinvalider Patienten in akutem Schub oder anhaltender Progredienz.

3. *Toxicomanien* (5, resp. 9): Probanden, die wegen Toxicomanie (Analgetica oder Betäubungsmittel) eine Entwöhnungskur durchmachten.

4. *Psychopathien* (9, resp. 18): Zu dieser Gruppe wurden nur Psychopathen gezählt, die nicht noch an einer anderen Erkrankung litten.

5. *Alkoholismus chronicus* (15, resp. 21): Hier wurden Patienten eingereiht, die wegen chronischem Alkoholismus interniert waren und einen Leberschaden mittlerer Schwere aufwiesen.

6. *Schizophrenie* (21, resp. 37): Alle Patienten, die mit der Diagnose Schizophrenie interniert waren, wurden in dieser Gruppe zusammengefaßt (Abb. 2) und in Abb. 7 in folgende, aus der Krankengeschichte ersichtlichen Untergruppen eingeteilt:

a) hebephrene Schizophrenie (5, resp. 6)

b) paranoide Schizophrenie (9, resp. 17)

c) katatone Schizophrenie (5, resp. 9).

Die Differenz, die sich aus der Gesamtheit der in obigen Untergruppen aufgezählten Fällen gegenüber der Gesamtgruppe Schizophrenie ergibt, erklärt sich aus dem Umstande, daß einige Fälle mit der Diagnose chronische Schizophrenie oder Schizophrenie gepaart mit Psychopathie nicht bei den Untergruppen aufgeführt sind.

7. *Debilität* (4, resp. 7): Patienten, von welchen 3 (resp. 6) debil und 1 (resp. 1) imbecil waren. Der zu kleinen Zahl wegen fällt die pH-6-Methode für eine Bewertung außer Betracht.

8. *Leberschäden* (5, resp. 7): Die Patienten dieser Gruppe weisen alle einen mittelschweren oder schweren Leberschaden auf.

9. *Apoplexie* (6, resp. 7): Patienten, die mit Status nach Apoplexie hospitalisiert waren.

10. *Unbestimmter organischer Hirnschaden* (5, resp. 6): Unter dieser Gruppe figurieren Patienten mit Encephalose, mit Geburtsschäden, Gehirntraumen und Gehirntumoren.

11. *Dementia Arteriosclerotica Senilis* (6, resp. 11): Patienten mit schwerer Dementia Arteriosclerotica Senilis, welche eine Klinikaufnahme bedingte. Keiner von diesen Fällen wies aber einen Status nach Apoplexie auf.

12. *Depressive Entwicklung* (3, resp. 10): Diese Gruppe, die leider bei der pH-6-Methode für eine statistische Verwertung viel zu klein ist, betrifft Patienten mit manisch-depressiver Entwicklung.

Patienten mit nachweisbar erhöhter Senkungsreaktion (4, resp. 5, vgl. Abb. 4): In dieser Gruppe wurden Patienten vereinigt, welche in obigen Gruppen schon aufgeführt sind und eine nachweisbar erhöhte Senkungsreaktion im Momente der Blutentnahme hatten; darunter ein Apoplektiker, ein kataton Schizophrener, eine Dementia Arteriosclerotica Senilis, ein Leberschaden und 1 Patient, der in obiger Aufstellung nicht mit aufgeführt ist und sich einer Organneurose wegen in klinischer Behandlung befand.

Ergebnisse

Wie schon beschrieben, konnten wir bei unseren Versuchen 4 verschiedene Maxima feststellen, wobei offensichtlich nur diejenigen bei 510 und 550 mμ in konstantem Verhältnis vorliegen. Von den im Abschnitt «Krankengut» beschriebenen Gruppen ist die Caeruloplasminaktivität bei Gruppe 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und bei der als «Patienten mit nachweisbar erhöhter Senkungsreaktion» beschriebenen Gruppe (Abb. 2 und 4) erhöht; so insbesondere bei den schweren Fällen der Gruppe MS (2a) im Gegensatz zu den leichteren MS-Fällen (Gruppe 2b).

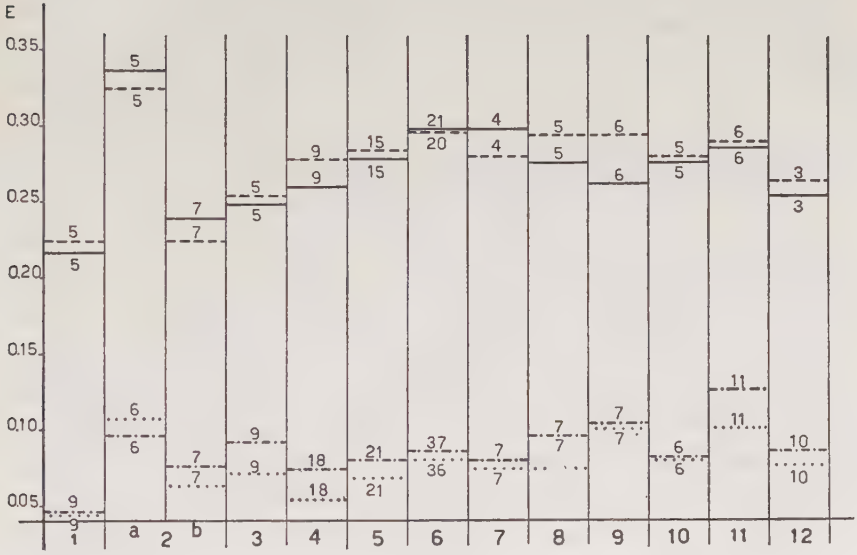


Abb. 2. Mittelwerte der Caeruloplasmin-Aktivität verschiedener Krankheitsgruppen bei λ = 550 mμ.

pH 6 Serum frisch——— pH 7 Serum frisch –.–.–

Serum alt – – – – – Serum alt .....

Abszisse: Diagnostische Gruppen: 1 = Normal, 2a = schwere MS, 2b = leichte MS, 3 = Toxocomanie, 4 = Psychopathie, 5 = Alkoholismus, 6 = Schizophrenie, 7 = Debilität, 8 = Leberschaden, 9 = Apoplexie, 10 = unbest. org. Hirnschäden, 11 = Dementia arterioscl., 12 = depress. Entwicklung.

Ordinate: Extinktion.

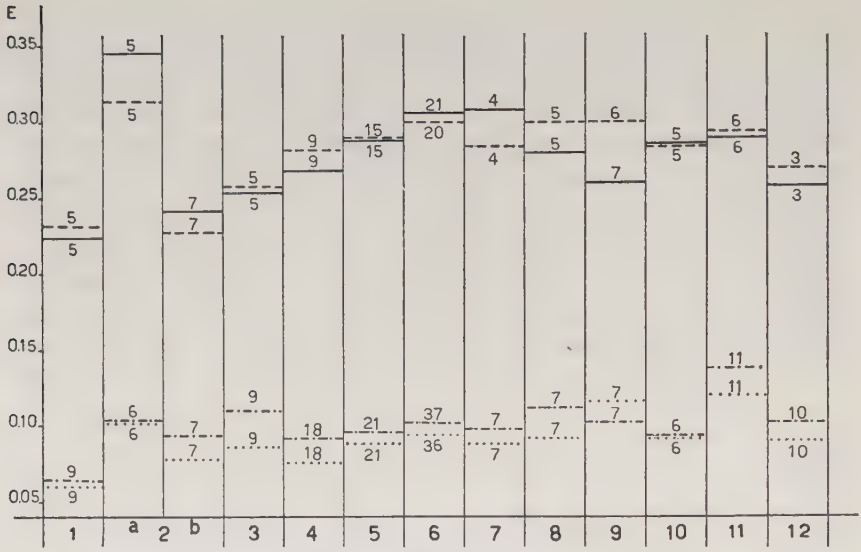


Abb. 3. Mittelwerte der Caeruloplasmin-Aktivität verschiedener Krankheitsgruppen bei $\lambda = 510$ mμ.

Legende wie Abb. 2.

Was die Aktivität des Caeruloplasmins bei frischem und altem Serum betrifft, so scheint kein wesentlicher Unterschied nachweisbar zu sein, indem sich die Vergleichskurven im allgemeinen sehr nahe kommen. Dies gilt besonders für die Messungen bei pH 6, während bei pH 7 relativ häufiger größere Differenzen vorkommen; die Haltbarkeit des Enzyms im Eisschrank ist demnach befriedigend.

Die Mittelwerte der Caeruloplasmin-Aktivität gemessen bei 510 mμ und 550 mμ sind einander sehr ähnlich, wobei die bei 510 mμ erhaltenen Werte um weniges höher sind. Die Messung der Enzymaktivität bei 470 mμ brachte über die bei 510 und 550 mμ gewonnenen Feststellungen hinaus keine wesentlich weitergehenden Erkenntnisse; wir verzichten darum hier auf deren Wiedergabe.

Bei den Schizophrenien (Abb. 4) scheint die Hebephrenie eine Ausnahme zu bilden, indem bei ihr die Ceruloplasmin-Aktivität vor allem bei pH 7 sowohl in bezug auf die Aktivitäts-Mittelwerte, als auch in bezug auf frisches und altes Serum keinen nennenswerten Unterschied zu den Normalfällen aufweist. Paranoide und Katatone weisen praktisch gleich stark erhöhte Werte bei beiden pH-Methoden auf. Die

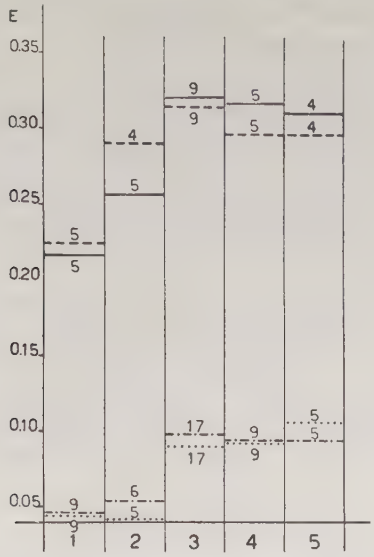


Abb. 4. Mittelwerte der Caeruloplasmin-Aktivität (λ = 550 mμ) bei Schizophrenen und bei erhöhter Blutkörperchen-Senkungsreaktion.

Legende wie Abb. 2, diagnostische Gruppen: 1 = Normal, 2 = Hebephrenie, 3 = Paranoid, 4 = Katatonie, 5 = Erhöhte BSR.

TABELLE II**

Signifikanz der Unterschiede in der Caeruloplasminaktivität zwischen Normalen und einigen Krankheitsgruppen

Krankengruppe	pH 6,0 f	pH 6,0 ν*	pH 7,0 f	pH 7,0 ν
MS schwer	5	2,09	6	2,22
MS leicht	7	0,56	7	1,76
Schizophrenien	21	*3,48*	37	*4,00*
Arteriosklerosen	6	2,42	11	*3,58*
Chronische Alkoholiker	15	*3,00*	21	2,96
Apoplexie	6	1,07	7	*3,29*

* Als gut gesichert sind nur ν-Werte über 3,0 anzusehen; bei Werten unter 2,0 ist die Differenz insignifikant.

** Die statistischen Berechnungen verdanke ich Herrn cand. phil *A. Hoffmann*, Neuenburg.

Caeruloplasmin-Aktivität ist ebenfalls deutlich erhöht bei Patienten mit erhöhter Senkungsreaktion (Abb. 4).

Leider war unser Krankengut zu klein, um für jede Krankheitsgruppe Signifikanzrechnungen ausführen zu können. Für die Methode bei pH 6 fanden wir jedoch bei den Schizophrenien und beim Chronischen Alkoholismus (Tabelle II) und für die Methode bei pH 7 bei den Schizophrenen, bei den senilen Arteriosklerotikern und bei Apoplexie eine statistisch stark gesicherte Erhöhung der Caeruloplasmin-Aktivität.

Ein direkter Vergleich mit der neuen Arbeit von *Rice* [40], welcher die Caeruloplasmin-Aktivität in Internationale Einheiten umrechnet, ist nicht möglich, da wir ein anderes Substrat verwendeten, das nicht zum gleichen Oxydationsprodukt führt. Wir geben unsere Werte in Tabelle III daher in Extinktionseinheiten wieder.

TABELLE III

Caeruloplasmin-Aktivität verschiedener Erkrankungen, ausgedrückt in Extinktions-Einheiten/min. · Liter Serum

Patientengruppe	N	M ± ΔM	Streubereich
Normale	5	*72,2* ± 6,0	46– 98
Frische und leichte MS	7	*79,7* ± 11,4	22–138
Toxicomanien	5	*83,1* ± 8,0	48–118
Manisch-Depressive	3	*85,0* ± 15,3	34–136
Psychopathien	9	*86,7* ± 8,7	36–137
Apoplexie	6	*87,2* ± 12,7	27–147
Unbekannte organ. Hirnschäden	5	*92,3* ± 9,4	52–133
Leberschaden	5	*92,3* ± 4,7	72–113
Alkoholismus, chronischer	15	*93,3* ± 3,0	71–116
Dementia Arteriosklerose senil.	6	*95,5* ± 7,6	60–132
Debilität	4	*99,5* ± 17,9	31–168
Schizophrenie (ges.)	19	*101,2* ± 9,6	21–182
Schwerinvalide MS	5	*112,0* ± 18,1	35–190
Erhöhte Senkungsreaktion (diverse Erkrankungen)	4	*104,0* ± 3,0	92–116

N = Anzahl Patienten, M = Mittelwert ± mittlerer Fehler (ΔM), gemessen bei λ = 550 mμ, pH-6-Methode, frisches Serum

$$M = E \frac{1\,cm}{550} \cdot 5000/15$$

Diskussion

Die Erhöhung der Caeruloplasmin-Aktivität ist keine krankheitsspezifische Reaktion; sie kann bei sehr verschiedenen Erkrankungen positiv ausfallen. Insbesondere aber ist eine solche Erhöhung im Zusammenhang mit Störungen des Hirn- und Leberstoffwechsels festzustellen. Diese Vermehrung des Caeruloplasmingehaltes ist u. U. mit einem verminderten Östrogenabbau bei ausgeprägtem Leberschaden in Zusammenhang zu bringen; erinnert sei nur an die bei schwangeren Frauen beobachtete, erhöhte Caeruloplasmin-Aktivität [33, 35, 46, 45]. Auch das veränderte Verhältnis Albumine/Globuline dürfte hier eine Rolle spielen, indem ja Albumine die fragliche Reaktion hemmen [12, 22, 23, 24, 29]. Bei erhöhter Blutkörperchen-Senkungsreaktion sind die Albumine bekanntlich zumeist vermindert, so daß auch deren hemmender Einfluß herabgesetzt und damit die enzymatische Aktivität erhöht ist. Wir verfügen allerdings über keine Eiweiß-Elektrophoresen der eigenen Fälle, so daß wir im untersuchten Einzelfall über die entsprechenden Verhältnisse nichts Verbindliches auszusagen vermögen.

Es ist denkbar, daß bei der Messung der Caeruloplasmin-Aktivität nicht die reine Oxydation des DPP erfaßt wird, sondern daß daneben noch eine Reihe anderer Substanzen aus dem Serum, eventuell sogar durch verschiedene Caeruloplasmine oxydiert werden. Für eine solche Annahme könnte u. U. auch die Beobachtung sprechen, wonach die Quotienten der Meßwerte pH 6/pH 7 bei den verschiedenen Gruppen von Kranken z. T. nicht identisch sind. Zudem weisen im Wellenbereich von 400 mμ (Abb. 5) Normalfälle und schwere Multiple Sklerosen auch insofern einen auffälligen Unterschied auf, als die Quotienten aus beiden pH-Methoden sich bei frischem und altem Serum gerade gegenteilig verhalten. Eine solche Umkehr gegenüber der Norm ist nur noch bei der Apoplexie leicht angedeutet.

Man könnte sich schließlich auch vorstellen, daß das Caeruloplasmin in verschiedenen Formen auftritt; beim Altern des Serums könnten verschiedenartige Enzymformen unterschiedlich betroffen werden, wodurch der normale Ablauf der Substrat-Oxydation in dieser oder jener Richtung beeinträchtigt würde.

Von diesen mehr spekulativen Erwägungen abgesehen, dürfte es hingegen zutreffen, daß die Aktivität des Caeruloplasmins (resp. der Caeruloplasmine) beim Altern des Serums langsam abnimmt, jene der Inhibitoren jedoch schneller, so daß im Endeffekt eine scheinbare Zunahme der Enzymaktivität resultiert. Es ließen sich mit dieser Vorstellung alle jene Fälle (vgl. Abb. 2 und 3) zwangslos erklären, bei

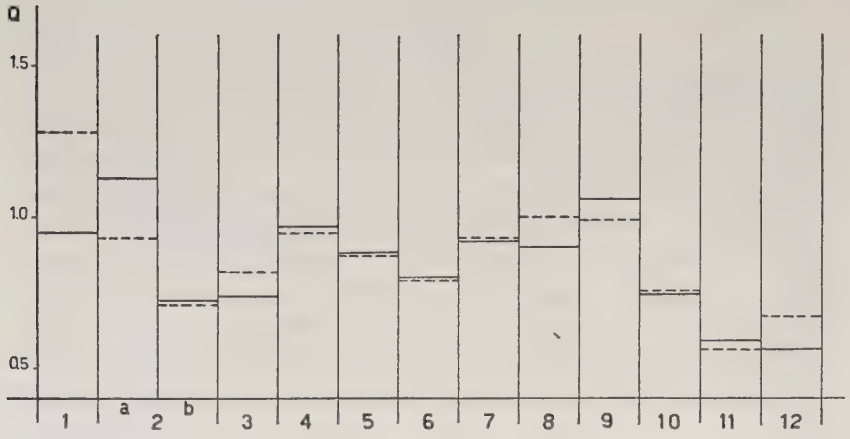


Abb. 5. Verhältnis zwischen den bei pH 6 und pH 7 gemessenen Caeruloplasmin-Mittelwerten für frisches und altes Serum bei $\lambda = 400$ mμ.

Serum frisch $\frac{\text{pH 6.0}}{\text{pH 7.0}}$ ——— Serum alt $\frac{\text{pH 6.0}}{\text{pH 7.0}}$ – – – – –

Abszisse: Diagnostische Gruppen wie Abb. 2. Ordinate: Verhältniszahl.

denen im gealterten Serum eine höhere Aktivität als im frischen Serum gefunden wird. Sind hingegen die Inhibitoren schon von Anfang an nur in geringen Mengen vorhanden, so fällt ihr Verlust nicht wesentlich ins Gewicht und es wird auch im Endeffekt eine Abnahme einer Enzymaktivität festzustellen sein.

Unter Berücksichtigung all dieser Momente können in rein praktischer Beziehung die folgenden Ergebnisse festgehalten werden: a) die von *Leach and Heath*, sowie *Oezek* [31, 38] beschriebene erhöhte Caeruloplasmin-Aktivität bei *Schizophrenie* konnten wir bestätigen. Eine solche Erhöhung ist aber, in Übereinstimmung mit anderen Autoren, auch bei einer Reihe weiterer, psychiatrischer und neurologischer Affektionen anzutreffen. b) Bei der *Multiplen Sklerose*, über welche hier in diesem Zusammenhang u. W. erstmals berichtet wird, ergibt sich eine mit der Schwere des Falles kongruente *Steigerung* der Aktivität des Caeruloplasmins; dies im Gegensatz zum *Morbus Wilson*, der eine echte *Verminderung* dieses Enzyms aufweist.

Obwohl wir uns insgesamt auf ein nicht unbeachtliches Krankengut von 155 Fällen stützen können, sind einzelne Krankheitsgruppen zahlenmäßig nicht ausreichend vertreten, um die Unterschiede gegenüber

der Norm mit genügender Signifikanz zu erfassen. Immerhin ist es bemerkenswert, daß in der Gruppe der MS nur die schweren Fälle mit einiger Sicherheit eine Störung im Enzymhaushalt erkennen lassen, während für die größeren Gruppen der Schizophrenen und der Alkoholiker diese Alteration ganz allgemein als gesichert erscheint.

Zusammenfassung

1. Die Caeruloplasmin-Aktivität von 155 Seren neurologisch und psychiatrisch Kranker wurde größtenteils vergleichsweise mittels zweier methodischer Modifikationen (pH 6, pH 7) bestimmt.

2. Es wird eine Methode beschrieben, welche durch Verzicht auf einen separaten Serum-Leerwert die methodische Fehlerbreite verringert und dadurch Aufwand und Meßprozeß vereinfacht.

3. Erhöhte Caeruloplasminaktivität wurde bei folgenden Krankheitsgruppen gefunden: a) Multiple Sklerose, und zwar ausgeprägt nur bei schweren Fällen; b) Schizophrenie, jedoch vorwiegend nur bei katatonen und paranoiden Formen; c) Erkrankungen mit schweren Störungen im Leber- und Hirnstoffwechsel (chronischer Alkoholismus, Arteriosklerosis cerebralis senilis, Apoplexie); d) generell bei Erkrankungen mit Erhöhung der Globuline und damit der Blutkörperchen-Senkungsreaktion.

4. Die in der Literatur beschriebenen Befunde bei Schizophrenie werden durch diese Untersuchung bestätigt. Auffällig ist jedoch, daß bei MS, im Gegensatz etwa zum Morbus Wilson, eine ausgeprägte Aktivitätssteigerung festzustellen ist.

Summary

(1) The ceruloplasmin activity of 155 sera of neurologic and psychiatric patients was determined by means of 2 different methods (pH 6 and pH 7).

(2) A procedure has been described that emits separate samples of sera without substrate and thus simplifies the measurements.

(3) Increased ceruloplasmin activity was found in the following diseases.

(a) Multiple sclerosis (marked in severe cases only).

(b) Schizophrenia, chiefly in catatonic and paranoid forms.

(c) Diseases with severe disturbances in the liver and brain metabolism (chronic alcoholism, cerebral arteriosclerosis, apoplexia).

(d) Generally in diseases with increased globulin and thus increased speed of sedimentation of erythrocytes.

(4) The findings reported in the literature in schizophrenia are confirmed. In multiple sclerosis, in contrast to Wilson's disease, a marked increase of activity has been found.

Résumé

1° Nous avons examiné l'activité de la caeruloplasmine de 155 sérums de malades souffrants de maladies neurologiques et psychiatriques, au moyen de deux méthodes différentes (pH 6, pH 7).

2° Nous avons décrit un procédé qui, tout en renonçant à un témoin contenant du sérum sans substrat, diminue les différences des méthodes, tout en facilitant l'examen.

3° Nous avons trouvé une augmentation de la caeruloplasmine dans les maladies suivantes:

a) Sclérose en plaques, spécialement pour les cas graves.

b) Schizophrénie, mais en principe seulement chez les formes catatones et paranoïdes.

c) Toutes les maladies causant de graves perturbations dans le métabolisme du foie et du cerveau (alcoolisme chronique, artériosclérose cérébrale sénile, apoplexie).

d) Pour toutes les maladies, en général, où les globulines, et de ce fait les vitesses de sédimentation, sont augmentées.

4° Les données décrites dans la littérature concernant la schizophrénie ont été confirmées par notre travail. Il nous paraît remarquable que chez la sclérose en plaques, contrairement à la maladie de Wilson, une augmentation nette de l'activité a pu être constaté.

Resumen

1° Se ha determinado la actividad de caeruloplasmina en 155 sueros de enfermos neurológicos y psiquiátricos mediante dos métodos diferentes (pH 6, pH 7).

2° Se describe un método que prescindiendo del valor del suero sin substrato, disminuye el margen de error metódico, facilitando el examen.

3° En el siguiente grupo de enfermedades se ha observado un aumento de la caeruloplasmina:

a) Esclerosis múltiple, especialmente en los casos graves.

b) Esquizofrenia, predominantemente en las formas catatónicas y paranoides.

c) Afectaciones graves del metabolismo hepático y cerebral (alcoholismo crónico, arterioesclerosis cerebral senil, apoplegía).

d) En general en afecciones que dan lugar a aumento de las globulinas y por tanto a la velocidad de sedimentación.

e) Los hallazgos descritos en la literatura en los casos de esquizofrenia se confirman en nuestra investigación. Llama la atención sin embargo el aumento de la caeruloplasmina en la esclerosis en placas en contraste con lo que sucede en la enfermedad de Wilson.

Für Anleitung während der Versuche und wertvolle Ratschläge bei der Auswertung der Ergebnisse bin ich Herrn Dr. *H. P. Rieder* zu Dank verpflichtet. Ferner spreche ich auch Herrn Prof. *F. Georgi* für die Überlassung des Themas wie auch für sein persönliches Interesse bei der Abfassung der Arbeit meinen besten Dank aus.

Literatur

1. *Abood, L. G.; Gibbs, F. A.* and *Gibbs, E.:* Comparative study of blood ceruloplasmin in schizophrenia and other disorders. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago *77:* 643–645 (1957).
2. *Åkerfeldt, S.:* Oxydation of N, N-Dimethyl-p-phenylenediamine by serum from patients with mental disease. Science *125:* 117–119 (1957).
3. *Angel, C.; Leach, B. E.; Martens, S.; Cohen, M.* and *Heath, R. G.:* Serum oxydation tests in schizophrenic and normal subjects. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago *78:* 500–504 (1957).
4. *Bearn, A. G.:* Genetic and biochemical aspects of Wilson's disease. Amer. J. Med. *15:* 442–449 (1953).
5. *Bearn, A. G.* and *Kunkel, H. G.:* Biochemical abnormalities in Wilson's disease. J. clin. Invest. *31:* 616 (1953).
6. *Bearn, A. G.* and *Kunkel, H. G.:* Abnormalities of copper metabolism in Wilson's disease and their relationship to the aminoaciduria. J. clin. Invest. *33:* 400 (1954).
7. *Bearn, A. G.* and *Kunkel, H. G.:* Metabolic studies in Wilson's disease using Cu^{64}. J. Lab. clin. Med. *45:* 623–631 (1955).
8. *Blaha, H.; Gastager, H.; Tschabitscher, H.* und *Wewalka, F.:* (zitiert nach *G. Riva*). Klin. Wschr. *66:* 915 (1954).
9. *Boudin, G.* et *Pépin, B.:* La dégénérescence hépato-lenticulaire, nouvelle affection métabolique. Presse méd. *62:* 243–245 (1954).
10. *Broman, L.:* Separation and characterization of two ceruloplasmins from human serum. Nature, Lond. *182:* 1655–1657 (1958).

11. *Cartwright, G. E.; Hodges, R. E.; Gubler, C. J.; Mahoney, J. P.; Daum, K.; Wintrobe, M. M.* and *Bearn, W. B.:* Studies in Copper metabolism. XIII. Hepatolenticular degeneration. J. clin. Invest. *33:* 1487–1501 (1954).
12. *Cartwright, G. E.; Huguley, E. M.; Aschenbrucker, H.; Fay, J.* and *Wintrobe, M. M.:* Studies on the erythrocyte protoporphyrin, plasma iron and plasma copper in normal and anemic subjects. Blood *3:* 501 (1948).
13. *Cooper, A. M.; Eckhardt, R. D.; Falcon, W. W.* and *Davidson, C. S.:* Investigation of the aminoacidurie in Wilson's disease (Hepatolenticular degeneration): demonstration of a defect in renal function. J. clin. Invest. *29:* 265–278 (1950).
14. *McCosker, P. J.:* Paraphenylenediamine oxidase activity and copper-levels in mammalian plasmas. Nature, Lond. *190:* 887–889 (1961).
15. *Cumings, J. N.:* The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepatolenticular degeneration. Brain *71:* 410–415 (1948).
16. *Cumings, J. N.:* Copper storage in hepatolenticular degeneration and allied deseases. Proc. roy. Soc. Med. *47:* 152–154 (1954).
17. *Curzon, G.:* Discussion on Wilson's disease: the chemistry and biochemistry of coeruloplasmin. Proc. roy. Soc. Med. *52:* 64–67 (1959).
18. Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen *6:* 408 (1960).
19. Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen *6:* 535 (1960).
20. *Gitlin, D.* and *Janeway, Ch. A.:* Turnover of the copper and protein moieties of ceruloplasmin. Nature, Lond. *185:* 693 (1960).
21. *Gubler, C. J.; Lahey, M. E.; Cartwright, G. E.* and *Wintyrobe, M. M.:* Studies on copper metabolism. IX. The transportation of copper in blood. J. clin. Invest. *32:* 405–411 (1963).
22. *Heath, R. G.:* Physiol. and biochem. studies in schizophrenia with particular emphasis on mind brain relationships. Int. Rev. Neurobiol. *1:* 299–331 (1959).
23. *Holmberg, C. G.* and *Laurell, C. B.:* Investigations in serum copper: II. Isolation of copper-containing protein. Acta chem. scand. *2:* 550 (1948).
24. *Holmberg, C. G.* and *Laurell, C. B.:* Investigations in serum copper: III. ceruloplasmin as an Enzyme. Acta chem. scand. *5:* 476–480 (1951a).
25. *Holmberg, C. G.* and *Laurell, C. B.:* Investigations in serum copper IV. Acta chem. scand. *5:* 921–930 (1951b).
26. *Holmberg, C. G.* and *Laurell, C. B.:* Oxidase reactions in human plasma caused by coeruloplasmin. Scand. J. clin. Lab. Invest. *3:* 103 (1951).
27. *Hornbostel, H.:* Neuere Erkenntnisse über das hepato-lentikuläre Syndrom. Schweiz. med. Wschr. *84:* 7 (1954).
28. *Horst, W.:* Transport und Bindung im Serum. Untersucht mit Papierelektrophorese und radioaktiven Indicatoren (Fe 55/59, Cu 64, Co 56/57, Mn 52, Ga 67, S 35, J 131). Klin. Wschr. *32:* 961–963 (1954).
29. *Lahey, M. E.; Gubler, C. J.; Cartwright, G. E.* and *Winthrobe, M. M.:* Studies on copper metabolism. VI. Blood copper in normal human subjects. J. clin. Invest. *32:* 322–328 (1953).
30. *Leach, B. E.; Cohen, M.; Heath, R. G.* and *Martens, S.:* Studies of the role of ceruloplasmin and albumine in adrenaline metabolism. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago *76:* 635–642 (1956).
31. *Leach, B. E.* and *Heath, R. G.:* The in vitro oxidation of epinephrine in plasma. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago *76:* 44–450 (1956).

32. *Loiseau, P.:* Notions actuelles sur la cirrhose wilsonienne. Rev. int. Hépat. *6:* 311–345 (1956).
33. *Markowitz, H.; Gubler, C. J.; Mahoney, J. P.; Cartwright, G. E.* and *Winthrobe, M. M.:* Studies on copper metabolism. XIV. Copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. J. clin. Invest. *34:* 1948–1508 (1955).
34. *Mårtens, S.; Vallbo, S.* and *Melander, B.:* Studies on the role of ceruloplasmin in schizophrenia. Int. Rev. Neurobiol. *1:* 333–342 (1959).
35. *Morell, A.* and *Scheinberg, I. H.:* Heterogeneity of human ceruloplasmin. Science *131:* 930–932 (1960).
36. *Morell, A. G.* and *Scheinberg, I. H.:* Unpublished observations zitiert in *Scheinberg, J. H.* und *Sternlieb, I.:* Copper metabolism. Pharmacol. Rev. *12:* 355–381 (1960).
37. *Neish, W. J. P.:* Correlation between para-phenylene-diamine-oxidase activity and the copper content of rat serum. Experientia *15:* 21 (1959).
38. *Oezek, M.:* Über den Kupfergehalt des Serums bei Schizophrenen. Zbl. Neurochir. *135:* 236 (1956).
39. *Porter, H.* and *Folch, J.:* Brain copper protein fractions in the normal and in Wilson's disease. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago *77:* 8–16 (1957), Suppl. 1, p. 105–118 (1957).
40. *Rice, E. W.:* Standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme unites. Analyt. Biochem. *3:* 453–456 (1962).
41. *Rieder, H. P.; Ritzel, G.; Spiegelberg, H.* und *Gnirss, F.:* Serologische Versuche zum Nachweis von Traxein. Experientia *16:* 561–562 (1960).
42. *Riva, G.:* Das Serumeiweißbild, 2. Aufl., p. 135 (Huber, Bern und Stuttgart 1960).
43. *Riva, G.:* Das Serumeiweißbild, 2. Aufl., p. 158–159 (Huber, Bern und Stuttgart 1960).
44. *Sankar, S.:* Enzymatic activity of ceruloplasm. Fed. Proc. *18:* 441 (1959).
45. *Scheinberg, J. H.:* Relation of ceruloplasmin and plasma copper to hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). Progress in Neurobiology, pp. 52–63 (Hoeber, New York 1956).
46. *Scheinberg, J. H.; Cook, C. D.* and *Murphy, J. A.:* The concentration of copper and ceruloplasmin in maternal and infant plasma at delivery. J. clin. Invest. *33:* 963 (1954).
47. *Scheinberg, J. H.* and *Gitlin, D.:* Deficiency of coeruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration. Science *116:* 184 (1952).
48. *Scheinberg, J. H.* and *Morell, A. G.:* Exchange of ceruloplasmin copper with ionic Cu^{64} with reference to Wilson's disease. J. clin. Invest. *36:* 1193–1201 (1957).
49. *Scheinberg, J. H.* and *Sternlieb, I.:* Copper Metabolism. Pharmacol. Rev. *12:* 355 (1960).
50. *Schoen, R.* und *Südhof, H.:* Biochemische Befunde in der Differentialdiagnose Innerer Krankheiten, p. 238 (Thieme, Stuttgart 1960).
51. *Schultze, H. E.; Göllner, J.; Heide, K.; Schönenberger, M.* und *Schwick, G.:* 3e Colloq. Hôpital Saint-Jean, Bruges, 19 (1955), zitiert in *Riva, G.:* Das Serumeiweißbild (Huber, Bern und Stuttgart 1960).

52. *Schwob, R. A.* et *Lambert, P.:* Encycl. Méd.-Chirurg. Neurologie, tome 2, 17060, A^{10}, 1–9 (Paris).
53. *Stein, W. H.; Bearn, A. G.* and *Moore, S.:* The amino acid content of the blood and urine in Wilson's disease. J. clin. Invest. *33:* 410–419 (1954).
54. *Sullivan, F. L.; Martin, H. L.* and *McDowell, F.:* Wilson's disease, hepatolenticular disease. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago *69:* 756–759 (1953).
55. *Uriel, J.:* Etude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. Bull. Soc. Chim. biol. *39:* 105–118, suppl. 1 (1957).
56. *Uzman, L. L.* and *Denny-Brown, D.:* Amino-aciduria in hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). Amer. J. med. Sci. *215:* 599–611 (1948).
57. *Uzman, L. L.; Iber, F. L.; Chalmers, T. C.* and *Knowlton, M.:* The mechanism of copper deposition in the liver in hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). Amer. J. med. Sci. *231:* 511–518 (1956).
58. *Wolff, H. P.; Lang, N.* und *Knedel, M.:* Untersuchungen mit Cu^{64} über die Bindung des Kupfers am Serumeiweißkörper. Klin. Wschr. *33:* 186–187 (1955).

Adresse des Autors: Dr. Guido Fisch, 27, Avenue de la Gare, *Neuchâtel* (Schweiz)